

На правах рукописи

САГДАТОВА АЛИЯ АЛЬФРИДОВНА

**РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ, КЛИНИКО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
ЖЕЛЧНОКАМЕННОЙ БОЛЕЗНИ В РЕСПУБЛИКЕ БАШКОРТОСТАН**

14.01.04 – внутренние болезни

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург - 2018

Работа выполнена на кафедре пропедевтики внутренних болезней федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Загидуллин Шамиль Зарифович, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, заведующий кафедрой пропедевтики внутренних болезней федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Официальные оппоненты:

Сас Евгений Иванович, доктор медицинских наук, профессор 2-й кафедры терапии (усовершенствования врачей) федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Сайфутдинов Рафик Галимзянович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой терапии Казанской государственной медицинской академии – филиала федерального государственного бюджетного образовательного учреждения дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится “__”_____2018 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.090.01 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6-8, тел. 8(812)3387104, e-mail: usovet@spb-gmu.ru), зал заседания Ученого Совета)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6-8 и на сайте: <http://1spbgmu.ru>.

Автореферат разослан “__”_____2018 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор



Валерий Николаевич Марченко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования и степень ее разработанности

Желчнокаменная болезнь (ЖКБ) является широко распространенным заболеванием во всем мире, выявляется, как правило, на стадии сформировавшихся камней [Ильченко А.А., 2010]. В России частота этого заболевания составляет от 5 до 20 % [Ивашкин В.Т. и др., 2017].

Клинически ЖКБ протекает в виде хронического (ХКХ) и острого (ОКХ) калькулезного холецистита. Число больных ХКХ в Российской Федерации составляет около 12-20% [Мараховский Ю.Х., 2003]. В 85-90% случаев острого холецистита в желчном пузыре обнаруживаются камни, а сам приступ желчной колики примерно в 2/3 случаев является рецидивирующим проявлением ЖКБ [Кармазановский Г.Г., 2014].

Причина и механизм образования камней в желчном пузыре до настоящего времени окончательно не изучены, и, следовательно, существует много неясных и спорных моментов. В связи с высокой распространенностью этого заболевания разработка новых способов лечения, диагностики и профилактики стала одной из наиболее актуальных задач современной медицины. Решение этой задачи основывается на знании состава и структуры камней, механизма их образования, изменений в обмене липидов сыворотки крови, влияния генетических факторов риска на формирование заболевания, поскольку именно они определяют результаты эффективности медикаментозного и хирургического лечения [Полунина Т.Е., Полунина Е.В., 2004].

Изучение влияния генетических факторов на формирование ЖКБ является важной задачей для исследователей, так как они участвуют в регуляции метаболизма холестерина (ХС) – основного компонента конкрементов [Stinton L.M., 2012]. За последние десятилетия определен вклад в механизм развития ЖКБ семи основных классов генов-кандидатов, кодирующих белки, которые участвуют в литогенезе [Григорьева И.Н., 2007]. Среди них гены аполипопротеина В-100 (АРОВ), белка липопротеинового рецептора *LRPAP1*, АТФ-связанных кассетных (АВС) трансмембранных белков - транспортеров холестерина *ABCG5* и *ABCG8* и др.

Все вышесказанное обосновывает актуальность выбранного направления и целесообразность проведения дальнейших исследований, направленных на выявление нарушений в спектре липидов крови, полиморфных вариантов генов, кодирующих белки, которые участвуют в процессе формирования ЖКБ.

Цель исследования – оценка распространенности, выявление факторов риска желчнокаменной болезни и ее фенотипов на основе изучения физико-химических параметров желчных камней, клинических особенностей и генов предрасположенности к данному заболеванию в Республике Башкортостан.

Задачи исследования

1. Изучить уровень, структуру и динамику распространенности желчнокаменной болезни в Республике Башкортостан за 2005-2016 гг. по данным Медицинского информационно-аналитического центра Министерства здравоохранения Республики Башкортостан.
2. Провести физико-химический анализ смешанных желчных камней и разработать модель кристаллообразования и роста холелитов.
3. Провести анализ клинико-лабораторных данных желчнокаменной болезни по материалам терапевтического и хирургического отделений Городской клинической больницы № 21 г. Уфа.
4. Провести анализ ассоциаций полиморфных локусов генов аполипопротеина В-100 (*rs693*), белка липопротеинового рецептора *LRPAP1* (*rs11267919*), АТФ-связанных кассетных (АВС) трансмембранных белков - транспортеров холестерина *ABCG5* (*rs4131229*) и *ABCG8* (*rs11887534*) с риском развития желчнокаменной болезни у этнических групп русских и татар в Республике Башкортостан.
5. Провести анализ взаимосвязи наиболее значимых клинических признаков, а также полиморфных вариантов генов аполипопротеина В-100 *АРОВ-100* (*rs693*), АТФ-связанного кассетного (АВС) трансмембранного белка - транспортера холестерина *ABCG5* (*rs4131229*),

контролирующих липидный обмен, и их фенотипической реализации у больных с желчнокаменной болезнью.

Научная новизна исследования

Впервые представлены уровень и динамика распространенности желчнокаменной болезни в Республике Башкортостан за период с 2005 по 2016 год, свидетельствующие о сохраняющейся высокой частоте данной патологии.

Предложена модель образования смешанного желчного камня, которая постулирует формирование центров кристаллизации из арагонита и рост арагонитных кристаллов в радиальном направлении благодаря диффузии атомов кальция.

Выявлены маркеры риска развития хронического и острого калькулезного холецистита по полиморфным вариантам генов аполипопротеина В-100, АТФ-связанных кассетных (АВС) трансмембранных белков-транспортеров холестерина ABCG5.

Впервые созданы клинико-генетические модели для диагностики желчнокаменной болезни и ее фенотипов, которые позволяют представить количественную оценку формирования холелитиаза и выявить пациентов с факторами риска развития заболевания.

Научно-практическая значимость

Полученные данные о высокой распространенности желчнокаменной болезни в Республике Башкортостан и выявленные факторы риска развития заболевания являются основой для комплексной оценки состояния здоровья населения, обоснования медико-социальных мероприятий, воздействующих на факторы риска холелитиаза, в Республике Башкортостан.

Предложенная модель формирования смешанного желчного камня позволяет разработать пути оптимизации медикаментозных методов лечения.

Обнаруженные маркеры риска развития желчнокаменной болезни по полиморфным вариантам представленных генов с учетом этнической принадлежности дают основание формировать группы пациентов для проведения профилактических мероприятий.

Созданные клинико-генетические модели позволяют представить количественную оценку формирования холелитиаза и вероятность развития определенных фенотипов желчнокаменной болезни, а также выявить пациентов с факторами риска развития заболевания. Полученные данные, по мере развития доступности технологий генотипирования, могут быть использованы в организации диспансерной работы с больными гепатобилиарной патологией.

Внедрения результатов исследования

Результаты исследования и основные рекомендации, вытекающие из них, внедрены в лечебную практику гастроэнтерологического и хирургического отделений Государственного бюджетного учреждения здравоохранения Республики Башкортостан Городской клинической больницы № 21 г. Уфа. Основные положения диссертации используются в учебном процессе при чтении лекций и проведении практических занятий на кафедре пропедевтики внутренних болезней и кафедре факультетской хирургии с курсом колопроктологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» МЗ РФ.

Методология и методы исследования

Методологическую базу работы составили труды ведущих отечественных и зарубежных ученых в области гастроэнтерологии и генетики ЖКБ. Применен комплекс методов, включающий системный анализ, медико-статистические, клинические, биохимические, генетические методы исследования и медико-математическое моделирование. Источниками информации служили данные медицинской документации: Медико-информационного аналитического центра Министерства здравоохранения Республики Башкортостан (МЗ РБ), истории болезней, специализированные анкеты, результаты рентгеноструктурного и микроскопического анализа желчных камней, клинико-биохимического, генетического исследования больных желчнокаменной болезнью.

Положения, выносимые на защиту

1. Заболеваемость желчнокаменной болезнью в Республике Башкортостан характеризуется высокой распространенностью с тенденцией к росту.

2. Разработана модель формирования смешанных холелитов, центр кристаллизации которых формируется из арагонита с последующим ростом арагонитных кристаллов в радиальном направлении.
3. Аллель *X* полиморфного варианта *rs693* гена *APOB-100* и аллель *C* однонуклеотидной замены *rs4131229* в гене *ABCG5* определяют риск формирования желчнокаменной болезни у этнической группы татар в Республике Башкортостан.
4. Установлены фено-генетические факторы риска развития холелитиаза и его фенотипов: наличие генотипа X^+X^- гена *APOB-100*, повышение массы тела более 56 кг, уровень лейкоцитов, связанного билирубина, липидные изменения – для желчнокаменной болезни; для хронического калькулезного холецистита - наличие генотипа $X+X-$ полиморфного варианта *rs693* гена *APOB-100*, изменения липидного обмена; для острого калькулезного холецистита - наличие аллеля *C* полиморфного варианта *rs4131229* гена *ABCG5*, уровень связанного билирубина сыворотки крови, возраст старше 60 лет, изменения липидного обмена.

Степень достоверности

Достоверность результатов исследования, обоснованность выводов и рекомендаций основываются на достаточном количестве наблюдений, использовании комплекса современных лабораторных и инструментальных методов исследований (рентгеноструктурные, микроскопические, клинико-лабораторные, молекулярно- генетические, статистические и др.), наличии полной первичной документации, грамотной статистической обработке данных, применении современных методик сбора и обработки исходной информации с использованием пакета прикладных компьютерных программ: MS Office Excel 2013 (Microsoft), SPSS (версия 16.0), WinPepi v.11.32.

Личный вклад автора

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования. Основная идея, планирование научной работы, включая формулировку рабочей гипотезы, цели и задач, разработку дизайна исследования, анализ современной отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме, определение методологии и общей концепции диссертационного исследования проводились совместно с руководителем научной работы, заведующим кафедрой пропедевтики внутренних болезней ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» МЗ РФ, д.м.н. профессором Загидуллиным Ш.З.

Получение, интерпретация, статистическая обработка данных клинических и инструментальных исследований осуществлялись на базе гастроэнтерологического и хирургического отделений ГКБ № 21 г. Уфа. Изучение структуры и свойств желчных камней проводили в сотрудничестве с коллективом кафедры материаловедения и физики металлов ФГБОУ ВО «Уфимский государственный авиационный технический университет» (зав. кафедрой - д.ф.-м.н., профессор Зарипов Н.Г).

Клинико-генетические исследования проводились лично автором при содействии коллектива кафедры генетики и фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет» (зав. кафедрой - д.б.н., профессор Хуснутдинова Э.К).

Статистическая обработка первичных данных, трактовка и анализ полученных данных, написание и оформление рукописи диссертации выполнялись соискателем лично, представление результатов работы в научных публикациях и в виде докладов на конференциях осуществлялись совместно с научным руководителем.

Апробация работы

Основные результаты диссертации обсуждены на 78-ой Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Вопросы теоретической и практической медицины» (Уфа, 2013), научно-практических конференциях «Казанская школа терапевтов», посвященной 140-летию великого Российского терапевта С. С. Зимницкого (Казань, 2013), «Казанская школа терапевтов», посвященной 185-летию Российского терапевта Г.А. Захарьина (Казань, 2014), 80-ой научно-практической конференции

студентов и молодых ученых «Вопросы теоретической и практической медицины» (Уфа, 2015), VII съезде Российского общества медицинских генетиков (Санкт-Петербург, 2015), XXXVI Международной научно-практической конференции «Научная дискуссия: инновации в современном мире» (Москва, 2015).

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на заседании проблемной комиссии «Внутренние болезни» ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 14 печатных работ, в том числе 7 - в научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, их обсуждение, а также выводы, практические рекомендации и список литературы.

Материалы диссертации изложены на 128 страницах и иллюстрированы 20 таблицами, 22 рисунками. Библиографический указатель содержит 212 наименований, из которых 139 - зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Диссертационная работа выполнялась на базе ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет», ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», ФГБОУ ВО «Уфимский государственный авиационный технический университет».

Материалы и методы исследования

Распространенность и заболеваемость ЖКБ среди населения Республики Башкортостан изучались на основе официальных статистических материалов Медицинского информационно-аналитического центра Минздрава Республики Башкортостан за период с 2005 по 2016 гг.

Изучение структуры 25 желчных камней (7 конкрементов больных 1 группы и 18 – 2 группы), удаленных хирургическим путем по медицинским показаниям больных холелитиазом, проводилось с использованием оптического микроскопа Axiovert 100A, растрового электронного микроскопа JSM-6400, рентгеноструктурный анализ и химический состав камней – на дифрактометре ДРОН-4-07.

В основе клинико-генетического анализа положены результаты исследования 367 человек. 195 пациентов с ЖКБ (К 80) с клиническими проявлениями в стадии обострения в возрасте от 21 до 87 лет (средний возраст $56,1 \pm 0,9$ года) были разделены на 2 группы. 1 группу составили 115 больных, которым был выставлен диагноз (К 80.1) Хронический калькулезный холецистит в стадии обострения (ХКХ) (возраст от 23 до 84 лет, средний возраст $54,1 \pm 1,2$ года, из них мужчин – 21 (18%), женщин – 94 (82%). 2 группу - 80 пациентов с диагнозом (К 80.0) Острый калькулезный холецистит (ОКХ) (возраст от 21 до 87 лет, средний возраст $58,9 \pm 1,6$ лет, из них мужчин – 26 (33%), женщин – 54 (67%). Больные, входившие в исследование, имели различную этническую принадлежность (96 русских, 86 татар и 13 метисов) и были госпитализированы в гастроэнтерологическое и хирургическое отделения ГKB № 21 г. Уфа. Соотношение мужчин и женщин в общей группе больных ЖКБ составило 1:3, в 1-ой - 1:4 во 2-ой – 1:2. Популяционную контрольную группу составили 172 человека в возрасте $67,2 \pm 0,88$ лет, из них мужчин – 51 (30%), женщин – 121 (70%) человек различной этнической принадлежности (82 русских, 85 татар и 5 метисов). Диагноз ЖКБ, ХКХ и ОКХ устанавливался в соответствии с МКБ-10:

К 80 Желчнокаменная болезнь (холелитиаз)

К 80.0 Камни желчного пузыря с острым холециститом

К 80.1 Камни желчного пузыря с другим (хроническим) холециститом.

Согласно последним рекомендациям Российской гастроэнтерологической ассоциации и Европейской ассоциации по изучению болезней печени от 2016 года в исследование были включены пациенты с ЖКБ с клиническими проявлениями, разделенные на 1 группу без

осложнений (с ХКХ) и 2 группу с осложнением (с ОКХ). Основным критерием включения больных в исследование было наличие камней в желчном пузыре с хроническим (К 80.1) и острым холециститом (К 80.0). Критериями исключения были: холецистолитиаз без холецистита (К 80.2), камни желчного протока (К 80.3-80.5), другие формы холелитиаза (К 80.8), другие болезни желчевыводящих путей и его подрубрики (К83), холецистит без камней и его подрубрики (К 81), другие болезни желчного пузыря и его подрубрики (К 82), острый панкреатит, функциональная диспепсия, синдром раздраженного кишечника.

Из 115 пациентов с ХКХ 98 была проведена лапароскопическая холецистэктомия в плановом порядке, 17 больным - консервативная терапия. В группе пациентов с ОКХ 74 обследуемым была сделана лапароскопическая холецистэктомия, а 6 - м проводилась консервативная терапия.

Группу пациентов для оценки нарушения метаболизма липидов при ЖКБ составили 68 человек с данной патологией, из них 1 - составили 27 больных (24 женщины и 3 мужчин) с ХКХ, средний возраст $45,4 \pm 2,4$ лет; 2 группу - 41 пациент (26 женщин и 15 мужчин) с ОКХ, средний возраст $45,5 \pm 2,5$ лет и 22 – популяционный контроль.

Исследование осуществлялось с использованием коммерческих наборов Bioscop (Германия) на автоанализаторе Labsystem (Финляндия) для определения концентрации липидов сыворотки крови: общего холестерина (ХС), триглицеридов (ТГ), липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП), липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и индекса атерогенности.

Молекулярно-генетический анализ ДНК маркеров был проведен в лаборатории кафедры генетики и фундаментальной медицины Башкирского государственного университета. ДНК выделяли из периферической крови стандартным методом фенольно-хлороформной экстракции [Mathew S.C., 1984]. Полиморфные локусы генов аполипопротеина В-100 *APOB-100* (*rs693*), белка липопротеинового рецептора *LRPAP1* (*rs11267919*), АТФ-связанных кассетных (АВС) трансмембранных белков - транспортеров холестерина *ABCG5* (*rs4131229*) и *ABCG8* (*rs11887534*) исследовали с помощью полимеразной цепной реакции синтеза ДНК на амплификаторе «GeneAmp PCR System 2720» производства компании «Applied Biosystems» (США). Определение нуклеотидных замен осуществляли методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ-анализ).

Проведение исследования было одобрено Комитетом по этике Башкирского государственного медицинского университета. Работа выполнена на основе добровольного информированного согласия пациента в соответствии с п. 4.6.1. приказ № 163 (ОСТ 91500.14.0001-2002) Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Математическая обработка результатов проводилась с использованием пакетов программ: MS Office Excel 2013 (Microsoft), WinPepi v.11.32., программы SPSS (версия 16). При статистической обработке результатов вычислялись средние величины и их стандартные ошибки ($M \pm m$). При попарном сравнении частот аллелей и генотипов в группах больных и контроля использовались критерии χ^2 (р) для таблиц сопряженности 2×2 с поправкой Йейтса на непрерывность. При изучении взаимосвязей генетических полиморфизмов с клинически значимыми количественными признаками ЖКБ для сравнительного анализа применяли методы параметрической (по критерию Стьюдента) и непараметрической статистики (по критерию Манна-Уитни). Силу ассоциаций оценивали в значениях показателей отношения шансов - Odds Ratio (OR). Проведен полипараметрический анализ полученных данных с целью определения бинарной логистической регрессионной зависимости между ними, на основе которой была оценена вероятность возникновения желчнокаменной болезни. Для описания зависимости между факторами риска и возникновением ЖКБ использована регрессионная модель.

Результаты исследования и их обсуждение

1. Распространенность болезней желчного пузыря и желчевыводящих путей

При проведении анализа заболеваемости по болезням органов пищеварения на территории Республики Башкортостан за период 2005-2016 гг. обнаруживается снижение роста общей заболеваемости болезнями органов пищеварения среди детей 0-14 лет в 2016 году на 28,6 %,

среди юношей - на 10%. В то же время регистрируется повышение общей заболеваемости по болезням органов пищеварения среди подростков в 2016 году на 6 %, среди девушек - на 17,3 %, среди взрослого населения - на 14,8 % по сравнению с 2005 годом. Отмечается повышение показателей общей заболеваемости болезнями желчного пузыря и желчевыводящих путей - среди детей - на 25 %, среди юношей – на 10,8% и по сравнению с 2005 годом. Заболеваемость ЖКБ за отчетный период у детей 0-14 лет выросла на 7,6%, у девушек - на 5,9%, у взрослых – на 18,6%; хроническим некалькулезным холециститом выросла у девушек на 2,9%, у взрослых – на 10,4%.

В то же время наблюдается снижение роста болезнями желчного пузыря и желчевыводящих путей среди подростков в 2016 году на 8,2 %, среди девушек - на 6,2%, а среди взрослого населения - на 14 % по сравнению с 2005 годом. Также регистрируется снижение общей заболеваемости функциональными болезнями желчевыводящих путей у подростков на 4,3%, юношей - на 8,6% и девушек - на 17,6%, взрослых – на 47,3%; хроническим некалькулезным холециститом снизилась у детей – на 1,9%, подростков – на 8,2%, юношей – на 20,9 %. Анализ данных о первичной заболеваемости показывает снижение первичной заболеваемости детей болезнями желчного пузыря и желчевыводящих путей с 1131,7 до 905,5, и юношей - с 976,4 до 759,6 на 100000 населения.

Первичная заболеваемость болезнями желчного пузыря и желчевыводящих путей среди подростков возросла с 1028,5 до 1065,1, среди девушек – в 1,3 раза за период с 2005 по 2016 гг., а среди взрослого населения уменьшилась с 464, 4 чел. на 100 тыс. населения в 2005 году до 303,7 чел. на 100 тыс. населения РБ в 2016 г. Отмечается снижение впервые выявленной заболеваемости ЖКБ среди детей 0-14 лет – на 8,6%, среди подростков - на 29,7%, функциональными болезнями желчевыводящих путей среди детей – на 35%, среди юношей – на 38,3%, и некалькулезным холециститом среди юношей – на 31,8%. Регистрируется рост первичной заболеваемости ЖКБ среди юношей – на 23,2%, среди девушек – на 29%, среди взрослых – на 29,7%, функциональными болезнями желчевыводящих путей среди подростков – на 24,6%, среди девушек – на 49,7% и среди взрослых – на 33,8%, некалькулезным холециститом – среди детей – на 24,2%, среди подростков – на 11,9%, среди девушек – на 65,9%, среди взрослых – на 44%.

Наблюдается рост числа холецистэктомий на 21,4 % и снижение летальности на 0,1 % за отчетный период в Республике Башкортостан.

Таким образом, заболеваемость населения Республики Башкортостан ЖКБ характеризуется высокой распространенностью и постоянно растёт. В связи с этим представляет интерес поиск диагностических аспектов холелитиаза для возможности раннего выявления данной патологии.

2. Химический анализ и структура желчных камней, извлеченных после холецистэктомии

По морфологии изучаемые камни относились к граненым, при этом количество граней составляло от 6 до 10. В микроструктуре желчных камней отчетливо выделяются три области: центральная, промежуточная и периферическая, отличающиеся как по цвету, так и по площади (рисунок 1).



Рисунок 1 - Шлиф желчного камня

В результате рентгеноструктурного анализа было обнаружено, что в состав всех областей желчного камня входят хорошо окристаллизованный безводный холестерин C₂₇H₄₆O и карбонат кальция CaCO₃, в частности, арагонит. При этом в периферической области по

сравнению с другими присутствует незначительное количество CaCO_3 . Результаты микроскопического анализа показали, что исследуемые желчные камни имеют радиально-слоистую структуру с несколькими сросшимися в процессе формирования центрами кристаллизации (рисунок 2).

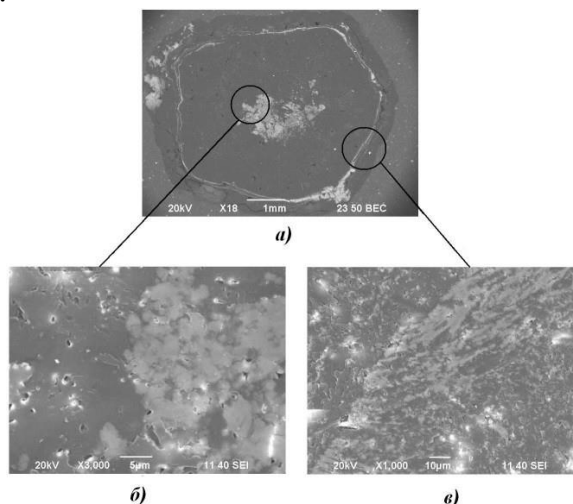


Рисунок 2 - Микроструктура желчного камня (РЭМ)

Результаты химического анализа показали, что в состав входят такие металлические элементы, как Na, Mg, Si, K, Fe, Zr, Al. Из неметаллических элементов в составе присутствуют C, O, Cl, S, P. Центральная область обогащена не только Ca, являющимся одним из основных элементов в составе камней, но и P. Промежуточная область по сравнению с центральной характеризуется повышенным количеством кальция, резко возрастающим от 25,8 до 83,13 ат.%. В периферийной области наблюдалось уменьшение содержания кальция до 4,63 ат.%.

Согласно результатам твердометрии центральная область состоит из кристаллов арагонита с повышенным содержанием металлических элементов. Уменьшение микротвердости в промежуточной области связано с наличием арагонита и холестерина. По направлению к периферии камня, состоящей преимущественно из холестерина, микротвердость уменьшалась.

На основе полученных данных была построена модель возможного механизма формирования желчного камня в организме человека: происходит адсорбция холестерина на поверхность арагонитного центра, рост кристаллов арагонита осуществляется благодаря диффузии атомов кальция из желчи через холестерин в радиальном направлении. На конечной стадии формирования вокруг конкремента образуется периферическая область, которая состоит преимущественно из холестерина (рисунок 3).

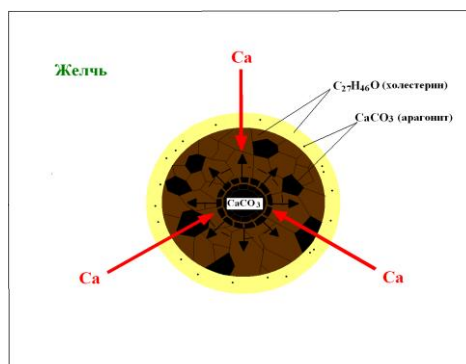


Рисунок 3 - Модель механизма формирования желчного камня

Таким образом, структура исследованных желчных камней смешанного типа - радиально-слоистая, разделена на три области (центральную, промежуточную и периферическую). Центральная и промежуточная области образованы скоплением отдельных микросферолитов арагонита и органических веществ. Периферическая - состоит из безводного холестерина и

незначительного количества арагонита. В процессе формирования желчного камня, вероятно, образуются центры кристаллизации из арагонита и происходит рост арагонитных кристаллов в радиальном направлении.

3. Клинические особенности острого и хронического калькулезного холецистита

Полученные в нашем исследовании данные показали, что различные факторы влияют на возникновение и развитие ЖКБ. Анализ состава групп больных по постоянным факторам свидетельствовало, что ЖКБ чаще встречалась у женщин (75,9%), причем с ХКХ - в 82% случаях, а с ОКХ – в 67,5%. Соотношение мужчин и женщин в группе больных ЖКБ составило 1:3, в группе с ХКХ - 1:4 в группе с ОКХ – 1:2. Увеличилась частота встречаемости ЖКБ с возрастом в обеих группах пациентов, причем у лиц старше 60 лет достоверно ($p<0,05$) чаще регистрировался ОКХ в 53 %.

При анализе состава групп больных по изменчивым факторам (таблица 1) выявлено, что в анамнезе 3 и более беременности, как фактор риска развития заболевания, наблюдались у 73 женщин (49%) с ЖКБ, у 54 (57%) пациенток - с ХКХ, а у 35 (65%) пациенток с ОКХ - до 3 беременностей. Установлено, что у больных ЖКБ в 4,6 раз чаще встречалась многократная беременность, чем в контроле ($p<0,05$). У больных в 1 группе в 2,48 раз чаще встречалась многократная беременность, чем у пациентов с ОКХ ($p<0,05$). Количество женщин с ХКХ в периоде менопаузы составило 77 человек (67%), с ОКХ – 40 человек (74%). Достаточно часто ЖКБ протекала на фоне сопутствующей сердечно-сосудистой патологии (гипертоническая болезнь, ишемическая болезнь сердца, стенокардия напряжения): 38 (33%) случаев - в 1 группе, 8 (10%) случаев - во 2. У лиц с ХКХ сердечно-сосудистые заболевания встречались в 4,44 раза чаще, чем у больных ОКХ ($p<0,05$). Сопутствующий хронический паренхиматозный панкреатит чаще встречался у больных 2 группы, чем у индивидов с ХКХ ($p<0,05$). Сахарный диабет был зарегистрирован у 13% пациентов с ХКХ и 22,5% больных с ОКХ ($p<0,05$).

Таблица 1 - Характеристика влияния изменчивых факторов на развитие ЖКБ, n (%)

	Признаки	Заболевание			Контроль
		ЖКБ	ХКХ	ОКХ	
Данные анамнеза заболевания	Количество беременностей: 0-2	43 (29)	40 (43)	35 (65)	109(83)
	3 и более	73 (49)*	54 (57)*	19 (35)	23(17)
	Менопауза	132(89)	77 (67)	40(74)	34 (20)
Сопутствующие заболевания	Хронический панкреатит	142(73)	64 (56)	78 (97)*	0
	Сахарный диабет	33 (17)	15 (13)	18(22,5)*	5 (3)
	Патология сердечно - сосудистой системы	46 (24)*	38 (33)*	8 (10)	0
Клинический признак	Боли в животе	187(96)	107(93)	80 (100)	0
	Горечь во рту	83 (43)	60 (52)	23 (29)	0
	Метеоризм	87 (45)	77 (67)*	10(12,5)	0
	Запоры	96 (49)	85 (74)*	11(14)	0
	Тошнота, рвота	112(57)	36 (31)	76 (95)*	0

Таблица 1 - Характеристика влияния изменчивых факторов на развитие ЖКБ, n (%) (продолжение)

Индекс массы тела	Нормальный вес, ИМТ=18,5-24,9 кг/м ²	84 (43)	42 (36)	42 (52)	120 (69,8)
	Избыточный вес, ИМТ=25-29,9 кг/м ²	66 (34)	35 (30)	31 (39)	48 (27,9)
	Ожирение 1 ст., ИМТ= 30-34,9 кг/м ²	31(16)	25 (22)	6 (8)	3 (1,7)
	Ожирение 2 ст., ИМТ=35-39,9 кг/м ²	11(6)	10 (9)	1 (1)	1 (0,6)
	Ожирение 3 ст., ИМТ=40 и более кг/м ²	3 (1)	3 (3)	0	0
	Всего больных с ИМТ > 25 кг/м ²	111(57)*	73 (63)*	38(47,5)	52 (30)

Прим.: * различия между группами по сравнению с контролем с уровнем значимости $p < 0,05$

В клинической картине преобладали боли в животе среди больных ЖКБ в 96% случаев (у 93% больных в 1 группе и у 100% – во 2-й). На горечь во рту, метеоризм и запоры жаловалось большинство пациентов с ХКХ, а на тошноту и рвоту – чаще больные с ОКХ. Ожирение является широко распространенным неблагоприятным фактором риска ЖКБ. Среди обследованных нами больных масса тела, превышающая нормальные показатели, выявлена у 57% индивидов с ЖКБ ($p < 0,05$), причем у индивидов с ХКХ чаще, чем с ОКХ ($p < 0,05$). Ожирение 1 ст. (30-34,9 кг/м²) было у 25, ожирение 2 ст. (35-39,9 кг/м²) - у 10, ожирение 3 ст. - у 3 (40 и более кг/м²) человек в группе ХКХ. Для ОКХ эти цифры составили: ожирение 1 ст. - у 6 больных, ожирение 2 ст. - у 1 пациента.

Таким образом, полученные результаты свидетельствовали о том, что для пациентов с ХКХ клинически характерно: из постоянных факторов - женский пол, а из изменчивых - 3 и более беременности, наличие среди сопутствующей патологии сердечно-сосудистых заболеваний и избыточная масса тела.

ОКХ клинически выражался у лиц в возрасте старше 60 лет (постоянный фактор), с наличием сопутствующего хронического панкреатита, сахарного диабета, отмечающих тошноту, рвоту.

При анализе содержания липидов сыворотки крови установлено, что средние уровни общего холестерина ($5,73 \pm 0,25$ ммоль/л, $p < 0,05$), ЛПНП ($3,65 \pm 0,18$ ммоль/л), ТГ ($1,74 \pm 0,14$ ммоль/л) и индекса атерогенности ($4,11 \pm 0,19$) были выше, а уровень ЛПВП ($1,13 \pm 0,04$ ммоль/л, $p < 0,05$) ниже референтных значений у больных с ХКХ. У пациентов с ХКХ средний уровень холестерина ($5,47 \pm 0,16$ ммоль/л, $p < 0,05$) и индекс атерогенности ($4,22 \pm 0,21$) регистрировались выше нормы, ТГ ($1,23 \pm 0,07$ ммоль/л), ЛПНП ($2,88 \pm 0,14$ ммоль/л, $p < 0,05$) не превышали референтных значений, а показатель ЛПВП ($1,11 \pm 0,05$ ммоль/л, $p < 0,05$) был ниже оптимального уровня. У пациентов с ХКХ и ОКХ были выявлены 2 А, 2 Б и 4 типы гиперлиппротеинемий, которые имели наибольшее значение не только для атерогенеза, но и для заболеваний желчевыводящих путей.

На основании корреляционного анализа были выбраны факторы риска развития заболевания, между которыми установлена достоверная корреляционная связь. В целом при ЖКБ выявлена положительная корреляция средней силы между триглицеридами и индексом массы тела ($r = 0,38$, $p = 0,003$), триглицеридами и многократной беременностью ($r = 0,31$, $p = 0,048$), индексом атерогенности и холестерином ($r = 0,36$, $p = 0,005$), а также обратная ассоциация средней силы между ЛПВП и холестерином ($r = -0,44$, $p = 0,0006$). Установлена в 1 группе средняя

положительная корреляция между билирубином и многократной беременностью ($r=0,31$, $p=0,002$), триглицеридами и индексом массы тела ($r=0,43$, $p=0,033$) и обратная корреляция средней силы между ЛПВП и холестерином ($r=0,48$, $p=0,015$). Во 2 группе больных обнаружена положительная корреляция средней силы между ЛПНП и холестерином ($r=0,62$, $p=0,0003$), обратная взаимосвязь средней силы между ЛПВП и холестерина холестерином ($r=-0,45$, $p=0,008$), положительная корреляция слабой силы между билирубином и холестерином ($r=0,37$, $p=0,0005$).

Таким образом, у многорожавших женщин с избыточной массой тела, имеющих сопутствующие сердечно-сосудистые заболевания, ЖКБ чаще протекает в виде ХКХ с гиперхолестеринемией, метеоризмом и запорами.

У лиц в возрасте старше 60 лет с сопутствующими хроническим панкреатитом, сахарным диабетом ЖКБ протекает в виде ОКХ с нормотриглицеридемией, тошнотой, рвотой.

4. Анализ ассоциации полиморфного варианта гена аполиipoproteина В-100 с желчнокаменной болезнью

В гомеостазе холестерина – основного компонента конкрементов - участвует большое количество генов. АРОВ-100 содержится в липопротеинах и играет важную роль в метаболизме и транспорте холестерина в плазме крови. В экзоне 26, расположенного на хромосоме 2 гена АРОВ, идентифицирована однонуклеотидная замена 7673C>T (*rs693*), часто описываемая в литературе как Xba-полиморфизм [Blackhart B.D. et al., 1986]. Известны ассоциативные исследования этого полиморфного варианта с риском развития ишемической болезни сердца, инсулиннезависимого сахарного диабета, холестероза [Han T. et al., 2000].

Нами проведено генетическое исследование у 367 человек: 195 больных с ЖКБ и 172 человек популяционного контроля. Во всех исследованных группах наиболее часто встречался гетерозиготный генотип X+X- (52,11-59,77% случаев среди больных ЖКБ, 41,94-46,48% - среди лиц контрольной группы), гомозиготные генотипы X+X+ и X-X- встречались примерно с равной частотой.

Среди больных с диагнозом ХКХ маркерами повышенного риска развития заболевания являются аллель X+ полиморфного варианта *rs693* гена АРОВ-100, выявленный в 50,00% случаев у больных и в 40,48% случаев – у индивидов контрольной группы ($\chi^2=4,44$, $p=0,04$; OR=1,47; 95% CI 1,02-2,11), и гетерозиготный генотип *rs693* X+X-, встречающийся среди пациентов с частотой 61,70%, а в контроле – 46,38% ($\chi^2=4,67$, $p=0,03$; OR=1,86; 95% CI 1,09-3,18) (рисунок 4).

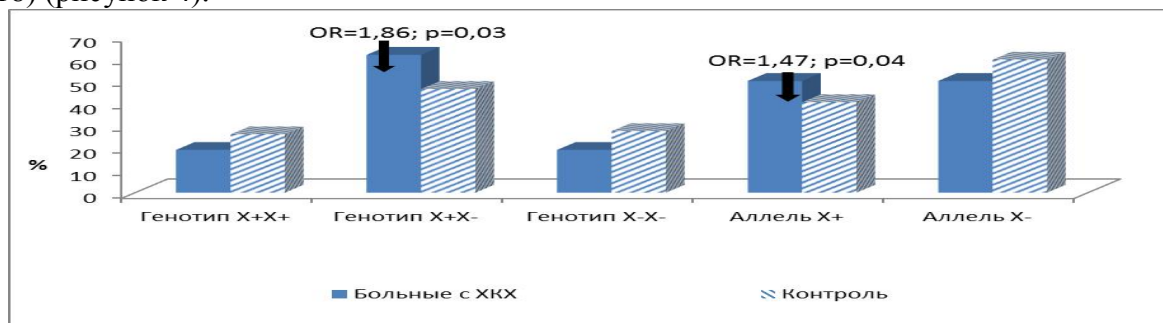


Рисунок 4 – Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного варианта *rs693* гена АРОВ-100 в выборках больных хроническим калькулезным холециститом и контрольной группы

Сравнительный анализ распределения частот аллелей и генотипов полиморфного локуса *rs693* между больными ЖКБ и индивидами контрольной группы в соответствии с их этнической принадлежностью выявил, что для больных русской этнической принадлежности характерна тенденция к увеличению частоты встречаемости гетерозиготного генотипа *rs693* X+X- по сравнению с представителями релевантной контрольной группы – 59,77% и 41,94%, соответственно ($\chi^2=3,93$, $p=0,05$). Установлено, что у лиц татарской этнической принадлежности аллель X-, обнаруженный у пациентов на 54,23% хромосом и на 37,63% хромосом в контроле, является маркером повышенного риска развития описываемой патологии

($\chi^2=9,13$, $p=0,003$; $OR=2,0$; $95\%CI$ 1,26-3,05), а аллель $X+$, соответственно, маркером пониженного риска развития ЖКБ ($\chi^2=9,13$, $p=0,003$; $OR=0,5$; $95\%CI$ 0,33-0,79) (таблица 2).

Таблица 2 - Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного варианта *rs693* гена *APOB-100* у больных ЖКБ и в контрольной группе

Группы больных		Генотипы			Аллели		N
		$X+X+$	$X+X-$	$X-X-$	$X+$	$X-$	
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Больные ЖКБ	<i>В целом</i>	31(18,90)	93(56,71)	40(24,39)	155(47,26)	173(52,74)	164
	ХКХ	18(19,15)	58(61,70)	18(19,15)	94(50,00)	94(50,00)	94
	ОКХ	13(18,57)	35(50,00)	22(31,43)	61(43,57)	79(56,43)	70
	Русские	16(18,39)	52(59,77)	19(21,84)	84(48,27)	90(51,72)	87
	Татары	14(19,72)	37(52,11)	20(28,17)	65(45,77)	77(54,23)	71
Конт роль	<i>В целом</i>	36(26,09)	64(46,38)	38(27,54)	136(40,48)	200(59,52)	138
	Русские	18(29,03)	26(41,94)	18(29,03)	62(41,33)	88(58,67)	62
	Татары	18(25,35)	33(46,48)	20(28,17)	121(62,37)	73(37,63)	71

Прим.: n – численность групп; N – объем выборки

Таким образом, выявлено, что для развития ХКХ маркерами повышенного риска являются аллель $X+$ и гетерозиготный генотип $X+X-$ полиморфного варианта *rs693* гена *APOB-100*, для татар маркерами повышенного риска развития заболевания является аллель $X-$ полиморфного варианта *rs693* гена *APOB-100*.

5. Анализ ассоциации инсерционно-делеционного полиморфизма (*rs11267919*) гена *LRPAP1* у больных с желчнокаменной болезнью

LRPAP1 – это рецептор-ассоциированный белок (RAP), представляет собой внутриклеточный белок с молекулярной массой 39 кДа, который является субъединицей ЛПНП рецептор – связанного белка (LRP) (Dixit M. et al., 2006).

Во всех исследованных группах с более высокой частотой встречался аллель *rs11267919 D* (на 66,42% хромосом в объединенной выборке больных и на 67,83% хромосом – в контрольной группе) (таблица 3).

Таблица 3 - Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного варианта *rs11267919* гена *LRPAP1* у больных ЖКБ и в контрольной группе

Группы больных		Генотипы			Аллели		N
		<i>II</i>	<i>ID</i>	<i>DD</i>	<i>I</i>	<i>D</i>	
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Больные ЖКБ	<i>В целом</i>	18(9,52)	81(42,86)	90(47,62)	132(33,58)	261(66,42)	189
	ХКХ	13(11,71)	39(35,14)	59(53,15)	65(29,28)	157(70,72)	111
	ОКХ	5(6,41)	42(53,85)	31(39,74)	52(33,33)	104(66,67)	78
	Русские	8(8,42)	43(45,26)	44(46,32)	59(31,05)	131(68,95)	95
	Татары	10(11,63)	34(39,53)	42(48,84)	54(31,40)	118(68,60)	86
Конт роль	<i>В целом</i>	16(11,19)	60(41,96)	67(46,85)	92(32,17)	194(67,83)	143
	Русские	5(7,14)	33(47,14)	32(45,71)	43(30,71)	97(69,29)	70
	Татары	11(15,07)	27(36,99)	35(47,95)	49(33,56)	97(66,43)	73

Прим.: n – численность групп; N – объем выборки

Среди генотипов реже встречался гомозиготный генотип *rs11267919 II* (в 9,52% случаев у пациентов с ЖКБ и 11,19% - контрольной группы). Разделение выборок на подгруппы в зависимости от этнической принадлежности не показало ассоциаций описываемого ДНК-локуса с риском развития ЖКБ. При исследовании инсерционно - делеционного полиморфизма в интроне 5 гена *LRPAP1* у больных ХКХ и ОКХ и сравнении их с группой контроля, а также в

зависимости от этнической принадлежности не было обнаружено статистически значимых различий ($p > 0,05$). Наши результаты согласуются с данными Juzyszyn Z. et al. (2008), которые не выявили ассоциацию данного полиморфного варианта с развитием ЖКБ у больных из Польши.

6. Анализ ассоциации полиморфного варианта *i7892 T>C (rs4131229)* гена *ABCG5* с желчнокаменной болезнью

Существенную роль в транспорте липидов и ХС выполняют белки семейства АТФ-связанных кассетных (АВС) транспортеров. Белки-транспортеры *ABCG5* и *ABCG8* регулируют транспорт липидов на различных уровнях, препятствуют избыточному захвату ХС в энтероцитах, участвуют в катаболизме ХС и регулируют его выведение с желчью.

Обнаружены статистически значимые различия в распределении частот аллелей между больными с ОКХ и индивидами контрольной группы: у больных достоверно чаще по сравнению со здоровыми индивидами, в 48,00% и 36,83% случаев, соответственно, выявлен аллель *rs4131229 C* ($\chi^2=5,37$, $p=0,02$; $OR=1,6$; 95% CI 1,07-2,34). Частота аллеля *rs4131229 T*, как и образованного им гомозиготного генотипа *rs4131229 T/T*, была выше в контрольной группе, чем в группе больных с ОКХ ($\chi^2=5,37$, $p=0,02$; $OR=0,6$; 95% CI 0,42-0,93 и $\chi^2=4,18$, $p=0,04$; $OR=0,5$; 95% CI 0,28-0,94 (рисунок 5).

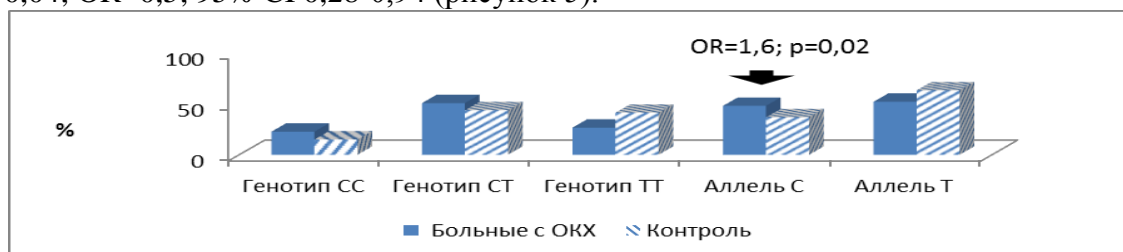


Рисунок 5 - Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного варианта *rs4131229* гена *ABCG5* в выборках больных острым калькулезным холециститом и контрольной группы

При сравнении групп больных и контроля согласно их этнической принадлежности обнаружено, что у татар аллель *C* однонуклеотидной замены *rs4131229* в гене *ABCG5*, выявленный на 46,88% хромосом у больных и 34,71% хромосом в контроле, является маркером повышенного риска развития ЖКБ ($\chi^2=5,06$, $p=0,02$; $OR=1,66$; 95%CI 1,07-2,58), а аллель *rs4131229 T* (больные – 53,11%, контроль – 65,29%) и генотип *rs4131229 T/T* (больные – 28,75%, контроль – 45,88%) являются маркерами пониженного риска развития ЖКБ ($\chi^2=5,06$, $p=0,02$; $OR=0,6$; 95%CI 0,39-0,94 и $\chi^2=4,45$, $p=0,03$; $OR=0,48$; 95%CI 0,25-0,91, соответственно) (таблица 4).

Таблица 4 - Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного варианта *rs4131229* гена *ABCG5* у больных ЖКБ и в контрольной группе

Группы больных		Генотипы			Аллели		N
		<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Больные ЖКБ	В целом	38(21,11)	80(44,44)	62(34,45)	156(43,33)	204(56,67)	180
	ХКХ	21(20,00)	42(40,00)	42(40,00)	84(40,00)	126(60,00)	105
	ОКХ	17(22,67)	38(50,67)	20(26,66)	72(48,00)	78(52,00)	75
	Русские	18(19,78)	35(38,46)	38(41,76)	71(39,01)	111(60,99)	91
	Татары	18(22,50)	39(48,75)	23(28,75)	75(46,88)	85(53,12)	80
Конт роль	В целом	25(14,97)	73(43,71)	69(41,32)	123(36,83)	211(63,17)	167
	Русские	12(14,63)	40(48,77)	30(36,60)	64(39,02)	100(60,98)	82
	Татары	13(15,29)	33(38,82)	39(45,88)	59(34,71)	111(65,29)	85

Прим.: n – численность групп; N – объем выборки

Таким образом, выявлено, что для развития ОКХ маркером повышенного риска является аллель *C* полиморфного локуса *rs4131229* гена *ABCG5*. Показано, что для татар маркерами повышенного риска развития холелитиаза является аллель *C* однонуклеотидной замены

rs4131229 в гене *ABCG5*.

7. Анализ ассоциации полиморфного варианта *rs11887534* гена *ABCG8* с желчнокаменной болезнью

У больных ЖКБ часто проводятся исследования замены *Asp19His* гена *ABCG8*. Исследователями среди населения о.Тайвань обнаружен повышенный риск развития желчнокаменной болезни у лиц моложе 50 лет с генотипом *Asp/His* полиморфного варианта *rs11887534* гена *ABCG8* (Куо К.-К. et al., 2008). Имеется также ряд работ, опровергающих связь описываемого локуса с развитием ЖКБ. Так, установлено, что риск развития патологии у пациентов из Чехии не связан с полиморфным вариантом *rs11887534* гена *ABCG8* (Hubacek J. A. et al., 2004).

Наиболее часто встречался аллель *rs11887534 G (Asp)* – на 93,68% хромосом у больных и 93,29% у лиц контрольной группы, и гомозиготный генотип *rs11887534G/G* (больные – 87,89%, контроль – 87,92%).

В нашем исследовании не было обнаружено достоверных различий в распределении частот аллелей и генотипов между изученными выборками пациентов с ЖКБ и контрольной группой (таблица 5).

Таблица 5 - Распределение частот аллелей и генотипов полиморфного варианта *rs11887534* гена *ABCG8* у больных ЖКБ и в контрольной группе

Группы больных		Генотипы			Аллели		N
		<i>CC</i>	<i>CG</i>	<i>GG</i>	<i>C</i>	<i>G</i>	
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Больные ЖКБ	<i>В целом</i>	1(0,53)	22(11,58)	167(87,89)	24(6,32)	356(93,68)	190
	ХКХ	0	14(12,50)	98(87,50)	14(6,25)	210(93,75)	112
	ОКХ	1(1,28)	8(10,26)	69(88,46)	10(6,41)	146(93,59)	78
	Русские	1(1,04)	9(9,38)	86(89,58)	11(5,73)	181(94,27)	96
	Татары	0	13(15,12)	73(84,88)	13(7,56)	159(92,44)	86
Конт роль	<i>В целом</i>	2(1,34)	16(10,74)	131(87,92)	20(6,71)	278(93,29)	149
	Русские	0	6(8,33)	66(91,67)	6(4,17)	138(95,83)	72
	Татары	2(2,60)	10(12,98)	65(84,42)	14(9,09)	140(90,91)	77

Прим.: n – численность групп; N – объем выборки

Используя мета-анализ исследованных полиморфных вариантов генов *APOB-100*, *LRPAP1*, *ABCG5* и *ABCG8* у русских и татар, не удалось обнаружить статистически значимых различий между выборками пациентов с ЖКБ и здоровых доноров ($p > 0,05$).

Анализ межгенных взаимодействий, проведенный с помощью компьютерных программ GMDR, показал, что статистически значимых сочетаний полиморфных вариантов *rs693* гена *APOB-100*, *rs11267919* гена *LRPAP1*, *rs4131229* гена *ABCG5* и *rs11887534* гена *ABCG8*, приводящих к развитию предрасположенности к желчнокаменной болезни, обнаружить не удалось.

8. Анализ взаимосвязи наиболее значимых клинических признаков и полиморфных вариантов генов аполиipoproteина В-100 *APOB-100 (rs693)*, АТФ-связанного кассетного (ABC) трансмембранного белка - транспортера холестерина *ABCG5 (rs4131229)*, контролирующего липидный обмен и их фенотипической реализации у больных с желчнокаменной болезнью

ROC-анализ и регрессионный логистический анализ показал, что наличие генотипа Х+Х- гена *APOB-100*, массы тела более 56 кг, повышение уровня связанного билирубина $> 2,9$ мкмоль/л, нарушений липидного обмена (ЛПНП $> 1,68$ ммоль/л и ЛПВП $\leq 1,26$ ммоль/л) и лейкоцитоза $> 6 \cdot 10^9$ /л наиболее связаны с развитием холелитиаза. С помощью ROC – анализа создана клиничко-генетическая диагностическая модель и простая диагностическая шкала ЖКБ, которые могут быть внедрены в ежедневную клиническую практику (таблица 6).

Таблица 6 - Параметры модели бинарной логистической регрессии и диагностическая шкала ЖКБ

Заболевание	Факторы риска	P	OR, отношение шансов	95%-ный доверительный интервал	Признак	Баллы
ЖКБ	Масса тела, кг	< 0,001	5,13	2,50 - 10,52	> 56	1
					≤ 56	0
	Лейкоциты, *10 ⁹ /л	< 0,001	24,76	13,32 - 46,04	> 6	1
					≤ 6	0
	Билирубин связ., мкмоль/л	< 0,001	598,47	33,88-10570,72	> 2,9	1
					< 2,9	0
	ЛПВП, ммоль/л	< 0,001	240,85	32,74 - 1771,69	≤ 1,26	1
> 1,26					0	
ЛПНП, ммоль/л	< 0,001	12,97	7,26 - 23,17	> 1,68	1	
				≤ 1,68	0	
Генотип X+X- гена <i>APOB-100</i>	0,04	1,54	0,98 - 2,42	Наличие	1	

На основании полученных в исследовании значений была разработана клиничко-генетическая модель для диагностики наличия заболевания:

$P(\text{ЖКБ}) = 1/1 + \exp(-79,55 + 1,63 * (\text{масса тела} > 56 \text{ кг}) + 3,21 * (\text{Лейкоциты} > 6 * 10^9/\text{л}) + 2,56 * (\text{ЛПНП} > 1,68 \text{ ммоль/л}) + 5,48 * (\text{ЛПВП} \leq 1,26 \text{ ммоль/л}) + 6,39 * (\text{Связ. билирубин} > 2,9 \text{ мкмоль/л}) + 0,43 * (\text{Генотип X+X- гена } APOB-100)$.

С помощью ROC-анализа построена ROC- кривая для оценки качества построенной модели (рисунок 6). Получены следующие характеристики созданной модели: чувствительность - 48,5 % (41,2- 55,7), специфичность - 91,9 % (87,0- 95,4). Площадь под ROC- кривой (AUC) составила 0,74.

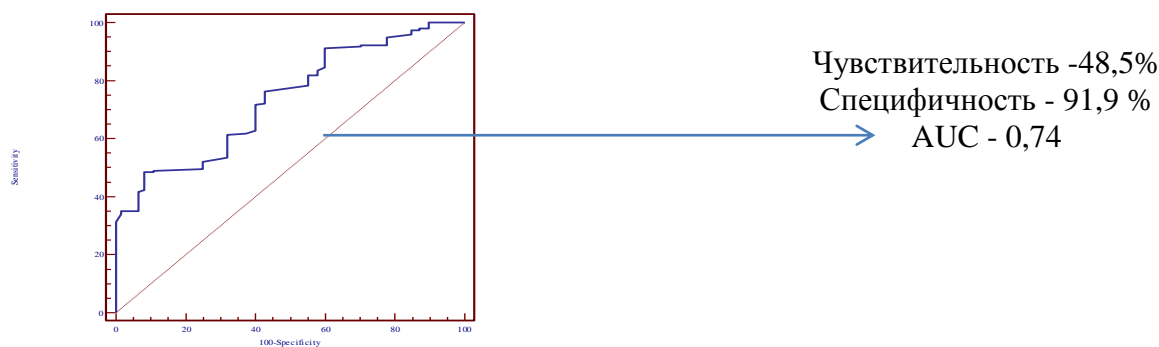


Рисунок 6 - Характеристика клиничко-генетической модели для диагностики наличия ЖКБ
Модель испытана на 22 больных ЖКБ, не входивших в группу исследования.

Результаты совпали с предсказанными в 14 (64 %) случаях.

9. Анализ взаимосвязи наиболее значимых клинических признаков, а также полиморфных вариантов генов *APOB-100 (7673C>T rs693)* и *ABCG5 (i7892 T>C rs4131229)*, контролирующих липидный обмен и их фенотипической реализации у больных с хроническим и острым калькулезным холециститом

Результаты ROC-анализа и регрессионного логистического анализа данных показали, что наличие высоких значений связанного билирубина, ЛПНП, ТГ и общего ХС, низких значений ЛПВП, возраста старше 60 лет и аллеля С гена *ABCG5* имело взаимосвязь с ОКХ, а наличие высокого общего ХС, ЛПНП, низкого ЛПВП и генотипа X+X- гена *APOB-100* – с ХКХ. Для более легкого использования результатов многомерного анализа были использованы

переменные, превращенные в категориальные единицы с помощью ROC – анализа, с созданием клинико-генетических шкал оценки риска развития фенотипов ЖКБ (таблица 7).

Таблица 7 - Бинарная логистическая регрессия факторов риска развития фенотипов ЖКБ

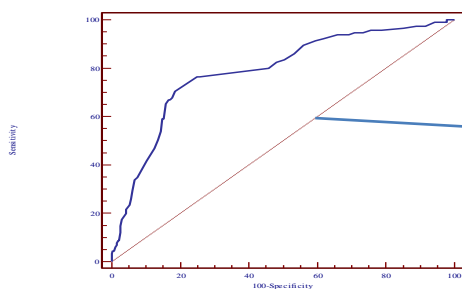
Заболевание	Факторы риска	P	OR, отношение шансов	95%-ный доверительный интервал	Признак	Баллы
ХКХ	Генотип X+X- гена <i>APOB-100</i>	0,042	1,849	1,022 - 3,349	Наличие	1
					Отсутствие	0
	Холестерин общий, ммоль/л	0,001	5,263	2,894 - 9,573	>5	1
					≤5	0
	ЛПНП, ммоль/л	0,001	3,984	2,081 - 7,624	>2,48	1
					≤2,48	0
ЛПВП, ммоль/л	0,001	3,179	1,825 - 5,539	≤1,09	1	
				>1,09	0	
ОКХ	Аллель С гена <i>ABCG5</i>	0,001	4,143	1,742- 9,849	Наличие	1
					Отсутствие	0
	Возраст, года	0,0002	6,6877	2,432-18,394	>60	1
					≤60	0
	ЛПВП, ммоль/л	0,001	10,844	3,809-30,873	≤1,08	1
					>1,08	0
	ЛПНП, ммоль/л	0,009	4,962	1,505- 16,363	>1,68	1
					≤1,68	0
	ТГ, ммоль/л	0,001	0,073	0,022 - 0,246	>0,74	1
					≤0,74	0
Холестерин общий, ммоль/л	0,015	3,636	1,289-10,255	>5	1	
				≤5	0	
Связанный билирубин, мкмоль/л	0,0002	30,219	5,148-177,406	> 4	1	
				≤ 4	0	

Разработаны клинико-генетические модели для оценки вероятности развития ОКХ и ХКХ, которые могут быть применены для диагностики ЖКБ в реальной клинической практике по мере развития доступности технологий генотипирования:

$P(\text{ХКХ}) = 1/1 + \exp(-3,073 + 1,157 * (\text{ЛПВП} \leq 1,09 \text{ ммоль/л}) + 1,382 * (\text{ЛПНП} > 2,48 \text{ ммоль/л}) + 1,661 * (\text{Холестерин} > 5 \text{ ммоль/л}) + 0,615 * (\text{Генотип X+X- гена ApoB-100})$.

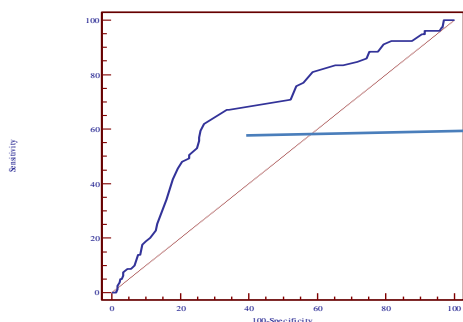
$P(\text{ОКХ}) = 1/1 + \exp(-5,98 + 3,41 * (\text{Св. билирубин} > 4 \text{ мкмоль/л}) + 1,9 * (\text{Возраст} > 60 \text{ лет}) + 2,384 * (\text{ЛПВП} \leq 1,08 \text{ ммоль/л}) + 1,602 * (\text{ЛПНП} > 1,68 \text{ ммоль/л}) + 1,421 * (\text{Аллель С гена ABCG5}) - 2,618 * (\text{ТГ} > 0,74 \text{ ммоль/л}) + 1,291 * (\text{Холестерин} > 5 \text{ ммоль/л})$.

Были получены следующие характеристики созданной модели вероятности развития ХКХ: чувствительность - 70,4% (61,2- 78,6), специфичность - 81,4% (76,2- 85,9). Для оценки качества модели построена ROC- кривая (рисунок 7). AUC составила: 0,79.



Чувствительность - 70,4%
 Специфичность - 81,4%
 AUC - 0,79

Рисунок 7 - Характеристика клинико-генетической модели для диагностики наличия ЖКБ
 Для модели вероятности развития ОКХ получены следующие характеристики: чувствительность - 62,0 % (50,4-72,7), специфичность - 73,0 % (67,6-77,9). Для оценки качества модели построена ROC- кривая (рисунок 8). AUC составила: 0,67.



Чувствительность - 62,0 %
 Специфичность - 73,0 %
 AUC - 0,67

Рисунок 8 - Характеристика клинико-генетической модели для диагностики наличия ОКХ
 Модели испытаны на 19 больных ЖКБ и 10 больных ОКХ, не входивших в группу исследования. Результаты совпали с предсказанными в 12 (63%) и 8 (80%) случаях, соответственно.

Таким образом, результаты проведенных исследований дали возможность определить распространенность, структуру и динамику заболевания ЖКБ в Республике Башкортостан за 2005-2016 гг., что позволяет оценить картину эпидемиологической ситуации, необходимую для разработки комплексных мероприятий по их профилактике на конкретных территориях.

Исследование структуры и химического состава желчных камней и разработка модели их формирования открывает перспективы для изучения процессов растворения желчных камней под воздействием химических агентов с целью получения новых технологий лечения ЖКБ.

Проанализированы особенности клинических проявлений ЖКБ и выявлены клинические признаки, ассоциированные с данным заболеванием. Проведенный анализ нарушений в липидном спектре у больных с ЖКБ и ОКХ позволяет рекомендовать при обследовании больных с патологией желчного пузыря и желчевыводящих путей учитывать основные факторы риска ЖКБ с показателями липидов сыворотки крови.

Результатами генетических исследований явились ассоциации аллеля X+ и гетерозиготного генотипа X+X- полиморфного варианта *rs693* гена *APOB-100* с ЖКБ, аллеля C полиморфного локуса *rs4131229* гена *ABCG5* с ОКХ, а для этнической группы татар маркерами повышенного риска развития ЖКБ являются аллель X- полиморфного варианта *rs693* гена *APOB-100* и аллель C однонуклеотидной замены *rs4131229* в гене *ABCG5*, которые позволяют расширить диапазон диагностических исследований при ЖКБ и ОКХ для оптимизации оказания медицинской помощи больным ЖКБ, учитывая этническую принадлежность. Выявленные генетические маркеры позволят улучшить прогноз индивидуального риска заболевания и характера течения холелитиаза.

С помощью ROC-анализа и регрессионного логистического анализа впервые обнаружены основные фено-генотипические факторы развития ЖКБ, с помощью которых созданы прогностические клинико-генетические модели риска развития холелитиаза и его фенотипов. Данные клинико-генетических исследований могут быть использованы для дальнейших

научных исследований механизмов развития желчнокаменной болезни.

ВЫВОДЫ

1. В структуре заболеваемости населения Республики Башкортостан за период 2005-2016 гг. зарегистрирован рост общей заболеваемости желчнокаменной болезнью среди детей 0-14 лет – на 7,6%, среди девушек - на 5,9%, среди взрослых – на 18,6%. Отмечается рост первичной заболеваемости желчнокаменной болезнью среди юношей – на 23,2%, среди девушек – на 29%, и взрослых – на 29,7%. За отчетный период наблюдается рост числа холецистэктомий в 21,4 раза и снижение летальности на 0,1 %.

2. Структура желчных камней смешанного типа - радиально-слоистая и имеет четкое разделение на три области (центральную, промежуточную и периферическую). Центральная и промежуточная области образованы скоплением отдельных микросферолитов арагонита и органических веществ. Периферическая - состоит из безводного холестерина и незначительного количества арагонита. Модель формирования смешанного желчного камня характеризуется образованием центров кристаллизации из арагонита и ростом арагонитных кристаллов в радиальном направлении.

3. У многорожавших женщин с избыточной массой тела, с сопутствующими сердечно-сосудистыми заболеваниями, гиперхолестеринемией, метеоризмом и запорами в подавляющем большинстве диагностирован хронический калькулезный холецистит. У лиц старше 60 лет, с тошнотой, рвотой, сопутствующими хроническим панкреатитом, сахарным диабетом, с нормотриглицеридемией - острый калькулезный холецистит.

4. Для развития хронического калькулезного холецистита маркерами повышенного риска являются аллель X+ и гетерозиготный генотип X+X- полиморфного варианта rs693 гена APOB-100, а для развития острого калькулезного холецистита – аллель C полиморфного локуса rs4131229 гена ABCG5. Аллель rs4131229 T и генотип rs4131229 T/T являются маркерами пониженного риска развития желчнокаменной болезни. ДНК-локусы rs11267919 гена LRPAP1 и rs11887534 гена ABCG8 не ассоциированы с риском развития холелитиаза.

5. Для этнической группы русских генотип X+X- полиморфного варианта rs693 гена APOB-100 является маркером повышенного риска развития желчнокаменной болезни (p=0,05). Для этнической группы татар маркерами повышенного риска развития желчнокаменной болезни являются аллель X- полиморфного варианта rs693 гена APOB-100 и аллель C однонуклеотидной замены rs4131229 в гене ABCG5 (p<0,05).

6. К основным фено-генотипическим факторам развития желчнокаменной болезни можно отнести генотип X+X- гена APOB-100, массу тела > 56 кг, уровень лейкоцитов >6*10⁹/л, липидные изменения (ЛПВП≤1,26 ммоль/л, ЛПНП>1,68 ммоль/л), уровень связанного билирубина >2,9 мкмоль/л, что позволило создать прогностическую клинико-генетическую модель риска развития холелитиаза; хронического калькулезного холецистита - генотип X+X- гена APOB-100, липидные изменения в виде ЛПВП ≤1,09 ммоль/л, ЛПНП>2,48 ммоль/л, уровень общего холестерина >5ммоль/л; острого калькулезного холецистита - аллель C гена ABCG5 и фенотипические признаки: уровень связанного билирубина сыворотки крови >4 мкмоль/л, возраст > 60 лет, липидные изменения в виде ЛПВП ≤1,08 ммоль/л, ЛПНП>1,68 ммоль/л, уровень общего холестерина >5ммоль/л.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Структура и динамика заболеваемости болезнями органов пищеварения, в частности желчнокаменной болезни, среди населения Республики Башкортостан свидетельствуют о медико-социальной значимости данной патологии и необходимости разработки лечебно-профилактических мероприятий по повышению качества оказания медицинской помощи больным с учетом эпидемиологической ситуации по заболеваниям желчевыводящих путей.
2. Комплексное исследование структуры и химического состава желчных камней и разработка модели их формирования открывают перспективы для изучения процессов растворения смешанных желчных камней под воздействием химических агентов на холестеринный и арагонитный составляющие конкрементов и усовершенствования литолитической терапии.

3. При обследовании больных с патологией желчного пузыря и желчевыводящих путей необходимо учитывать основные постоянные и изменчивые факторы риска желчнокаменной болезни (масса тела > 56 кг, сопутствующие сердечно-сосудистые заболевания, многократные беременности, возраст старше 60 лет, уровень связанного билирубина > 2,9 мкмоль/л, уровень лейкоцитов > $6 \cdot 10^9$ /л) с показателями липидов сыворотки крови.
4. Для проведения индивидуализированного лечения и профилактики желчнокаменной болезни, выявления группы повышенного риска развития заболевания следует проводить определение полиморфного варианта *rs693* гена *APOB-100*, *rs4131229* гена *ABCG5*.
5. Разработанные модели для оценки вероятности развития ЖКБ и ее фенотипов могут быть использованы в организации диспансерной работы с больными гепатобилиарной патологией в реальной клинической практике по мере развития доступности технологий генотипирования.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Комплексное исследование элементного состава камней желчного пузыря / А.А. Сагдатова, Н.Г. Зарипов, Э.Р. Шаяхметова [и др.] // Медицинский Вестник Башкортостана. – 2012. - Т. 7, № 6. – С. 96-99.
2. Причины развития и клиническая картина желчнокаменной болезни / А.А. Сагдатова, Т.М. Зиганшин, Э.Ф. Гимаев [и др.] // Дневник казанской медицинской школы. – 2013. - № 1. - С. 126.
3. Структура и свойства желчных камней / А.А. Сагдатова, Ш.З. Загидуллин, Н.Г. Зарипов, Э.Р. Шаяхметова // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. – 2013. - № 2. - С. 757-760.
4. Нарушения липидного обмена у больных с желчнокаменной болезнью / А.А. Сагдатова, Э.Ф. Аглетдинов, Н.И. Коваленко [и др.] // Дневник казанской медицинской школы – 2014. - № 2 (V). - С. 129-130.
5. Сагдатова, А.А. Анализ ассоциации Хва-полиморфизма гена аполипопротеина В- 100 и липидного спектра крови с хроническим калькулезным холециститом в Республике Башкортостан / А.А. Сагдатова, А.Х. Нургалиева, Э.Р. Шаяхметова // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. – 2015. - № 2 (приложение). - С. 1119-1124.
6. Связь полиморфного варианта *rs4131229* гена *ABCG5* с биохимическими показателями больных желчнокаменной болезнью / А.А. Сагдатова, А.Х. Нургалиева, Ш.З. Загидуллин, Э.К. Хуснутдинова // Современные проблемы науки и образования. – 2015. - № 3. – С. 140. URL: www.science-education.ru/123-19524.
7. Основные факторы риска желчнокаменной болезни / А.А. Сагдатова, Ш.З. Загидуллин, Э.Ф. Аглетдинов [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2015. - № 1-1. – С. 1379. URL: www.science-education.ru/121-18366.
8. Анализ ассоциации полиморфных вариантов генов *APOB-100*, *LRPAP1*, *ABCG5* и *ABCG8* с риском развития желчнокаменной болезни в Республике Башкортостан / А.А. Сагдатова, А.Х. Нургалиева, Ш.З. Загидуллин, Э.К. Хуснутдинова // Медицинская генетика. – 2015. – Т. 14, № 6 (156). – С. 35-42.
9. Характер ассоциации полиморфизма гена аполипопротеина В-100 с нарушениями липидного обмена у больных желчнокаменной болезнью / А.А. Сагдатова, А.Х. Нургалиева, Э.К. Хуснутдинова, Ш.З. Загидуллин // Вестник современной клинической медицины. - 2015. - Т. 8, № 3. - С. 28-32.
10. Сагдатова, А.А. Анализ ассоциации полиморфизма гена *ABCG5* и липидного спектра крови с острым калькулезным холециститом в Республике Башкортостан / А.А. Сагдатова, А.Х. Нургалиева, Э.Р. Шаяхметова // Научная дискуссия: инновации в современном мире. № 3-4 (35): сборник статей по материалам XXXV-XXXVI международной заочной научно-практической конференции. – М.: Изд. «Международный центр науки и образования», 2015. – С. 147-152.

11. Структура и состав смешанных желчных камней в процессе растворения в метил- трет-бутиловом эфире / А.А. Сагдатова, Э.Р. Шаяхметова, Н.Г. Зарипов, Ш.З. Загидуллин // Международный научно-исследовательский журнал. – 2015. - № 6 (37), Ч. 1: Сборник по результатам XL заочной научной конференции. – С. 89-92.
12. Многофакторная клиничко-генетическая модель развития желчнокаменной болезни / А.А. Сагдатова, Р.Х. Зулкарнеев, Э.К. Хуснутдинова [и др.] // Практическая медицина. – 2017. - № 6 (107). - С. 108-112.
13. Многофакторные клиничко-генетические модели развития острого и хронического калькулезного холецистита / А.А. Сагдатова, Р.Х. Зулкарнеев, Э.К. Хуснутдинова [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. – 2017. - Т. 12, № 4 (70). – С. 32-35.
14. Влияние ультразвуковой очистки смешанных желчных камней на их растворение в метил-трет-бутиловом эфире *in vitro* / А.А. Сагдатова, Э.Р. Шаяхметова, Н.Г. Зарипов, Ш.З. Загидуллин // Врач-аспирант. – 2017. – Т. 85, № 6.5. - С. 591-598.

Благодарность

Автор настоящего исследования выражает глубокую благодарность зав. кафедрой генетики и фундаментальной медицины ФГБОУ ВО «Башкирский государственный университет», д.б.н., академику АН РБ, профессору Э.К. Хуснутдиновой, доц. А.Х. Нургалиевой и зав. кафедрой материаловедения и физики металлов ФГБОУ ВО «Уфимский государственный авиационный технический университет», д.ф.-м.н., профессору Н.Г. Зарипову и аспиранту Э. Р. Шаяхметовой за совместную деятельность по выполнению отдельных фрагментов данной работы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ЖКБ –	желчнокаменная болезнь
ИА -	индекс атерогенности
ЛПОНП -	липопротеины очень низкой плотности
ЛПНП -	липопротеины низкой плотности
ЛПВП -	липопротеины высокой плотности
ОКХ –	острый калькулезный холецистит
ПФО –	Приволжский федеральный округ
РБ –	Республика Башкортостан
РФ -	Российская Федерация
РЭМ -	растровый электронный микроскоп
Св. билирубин –	связанный билирубин
ТГ –	триглицериды
ХКХ -	хронический калькулезный холецистит
ХС -	холестерин
OR -	Odds Ratio
95%CI –	Confidence interval (доверительный интервал)